

OTKA T043086 téma (2003-2006) zárójelentése

A jelentés elkészítése során a Kutatási Megbízási Szerződésben szereplő munkaterv beosztását követtük.

1/ A XIII-as faktor (FXIII) struktúrája és funkciója

1/A A FXIII-A Val34Leu polimorfizmusának funkcionális következményei

a. A FXIII-A Val34Leu polimorfizmus hatása az FXIII proteolitikus aktivációjára plazmában, illetve teljes vérben.

A kísérletek során plazmához thrombint adtunk, s komplex plazma környezetben vizsgáltuk a fibrinképződést, a fibrin γ lánc aktivált FXIII (FXIIIa) által történő keresztlinketést, a FXIII inkorporációját a fibrinhálóba és FXIII proteolitikus aktiválását (az aktivációs peptid lehasadását), illetve e jelenségek időbeli viszonyát. Kimutattuk, hogy a FXIII teljes mértékben inkorporálódik a fibrin hálóba és proteolitikus aktiválódása a fibrin felületén történik meg. Az aktivált FXIII a fibrin háléhoz kötve marad, soha nem jelenik meg a plazmában vagy szérumban. A FXIII aktiváció beindulása a fibrin polimerizáció kezdetétől függ, s arra nincs hatással a FXIII A alegység (FXIII-A) Val34Leu polimorfizmusa. Ugyanakkor azt, hogy a FXIII aktivációja milyen késéssel követi a fibrin polimerizációt a Val34Leu polimorfizmus lényegesen befolyásolja, s Leu34 esetében a lag fázis igen rövid. E konklúziót olyan kísérletekkel is bizonyítottuk, melyekben nagy tisztaságú, Val34, illetve Leu34 homozigóta egyénekből izolált FXIII-t adtunk FXIII hiányos plazmához (ez esetben a fibrin polimerizáció ugyanakkor következett be, és a Val34Leu polimorfizmus hatása a fibrin polimerizációtól függetlenül volt vizsgálható). Eredményeinket az alábbi közleményben foglaltuk össze: Shemirani et al. Biochim Biophys Acta 2006; 1764: 1420-3.

Megkíséreltük a vizsgálatokat teljes vérben is elvégezni, szöveti tromboplasztinnal indítva az alvadás folyamatát. Ez esetben azonban olyan sok változós rendszer befolyásolta a trombin képződés idejét, sebességét és a keletkezett trombin mennyiségét, hogy a rendszer végül nem bizonyult alkalmasnak érdemi következtetések levonására.

b. Az aktivációs peptid hatása az aktivált FXIII stabilitására.

Olyan rekombináns mutáns Faktor XIII-at állítottunk elő, mely nem tartalmazza az N-terminális 37 aminosavat, azaz az aktivációs peptidet. A mutáns azonban instabilnak bizonyult, COS sejtekben történt tranziens expresszió során lebomlik. E jelenség okát vizsgálva rájöttünk, hogy az aktivált FXIII az aktiváció következtében meglehetősen instabillá válik, 37 °C-on az aktivitása gyorsan csökken. Az, hogy az instabilitás valóban az aktivációs peptid lehasadásának köszönhető úgy bizonyítottuk, hogy rekombináns FXIII-A-ban az Arg37 reziduumot Gln-re cseréltük, ami lehetnéne teszi a trombin által történő proteolitikus aktiválást, s a mutánst nem proteolitikusan (Ca^{2+} jelenlétében magas ionerőn) aktiváltuk. Az így aktivált mutáns nem mutatott spontán inaktivációt. Jelenleg a proteolitikusan aktivált FXIII-ban bekövetkező, az inaktivációért felelős intramolekuláris változásokat vizsgáljuk.

1/B A FXIII A és B alegységek asszociációja, az asszociációért felelős strukturális elemek

a,b,d. A két típusú alegység összekapcsolódását akadályozó monoklonális ellenanyagok szelektálása. A komplex képződést gátló ellenanyagokkal reagáló epitópok, mimotópok identifikálása és lokalizációja.

A FXIII A és B alegységei ellen eddig több mint 100 monoklonális ellenanyagot állítottunk elő. Ezek közül két olyan antitestet (1A4F7, 1C6C7) találtunk, melyek nagy affinitással kötődtek a csak A alegységekből álló celluláris FXIII-hoz, de nem kötődtek a plazmában található A₂B₂ komplexhez. Előzetes várakozásunkkal és az első előkísérletekkel szemben azonban ezek az antitestek nem gátolták lényegesen az izolált B alegységnek az A alegységekhez történő kötődését. Ennek alapján nagyon valószínű, hogy az antitest olyan konformációs epitóphoz kötődik, mely az A alegységen megvan, de a komplex képződés során bekövetkezett strukturális változások következtében elvész.

A FXIII-B ellen az első immunizálás során képződött közel 60 monoklonális antitest között nem találtunk olyat melyek csak a szabad B alegységhez kötődnének. Új immunizálás eredményeképpen azonban 5 ilyen antitestet sikerült előállítani, s ráadásul ezek az antitestek gátolták az A₂B₂ komplex kialakulását. Az antitestek karakterizálása során kiderült, hogy három közülük csak a nem redukált B alegységgel reagál (a B alegység 10 egyenként két diszulfid híddal stabilizált, ún. sushi doménből áll), azaz a diszulfid hidak által stabilizált konformációs epitópok ellen termelődtek. Két FXIII-B ellenes antitest a redukált, alkilált, ill. deglikozilált B alegységgel is jól reagált, azaz szekvenciális epitóp ellen képződött.

A következőkben a FXIII-B ellenes, komplex képződést gátló antitestekkel reagáló epitópokat kíséreltük meg felelderíteni a FXIII-B strukturájában. Először fág "display" technikával és az egyes sushi doméneket kihagyó rekombináns FXIII-B molekulák előállításával kísérleteztünk, de egyik sem vezetett eredményhez. Jelenleg pepscan technikával és MALDI-TOF tömegspektrométeren hidrogén deutérium cserén alapuló technikával folytatjuk az epitóp (mimotóp) keresését. Úgy tűnik, ez az eddigieknél eredményesebb, mivel a két szekvenciális epitóp ellen irányuló antitest kapcsolódási helyét sushi domén szintjén sikerült beazonosítani.

Ebben az altémában részeredményeket nem kívántunk közölni, mert az epitópok identifikálása után szabadalmaztatni kívánjuk az ennek alapján feltároló terápiás lehetőséget, ill. a két típusú alegység kapcsolódásának gátlását előidéző peptideket/egyéb vegyületeket. Utóbbiak ugyanis egy új típusú, a FXIII szint csökkentésén alapuló antikoaguláns terápia lehetőségét vetik fel. Az említett okok miatt az első nemzetközi fórumon történő prezentáció is csak ez évben fog megtörténni (Katona et al International Society of Thrombosis and Haemostasis Kongresszusa, Genf 2007).

c. A protein A kötődése a FXIII-B-hez

A plazmában a FXIII-B kb. kétszeres feleslegben van a FXIII-A-hoz viszonyítva, azaz 50%-a szabad formában kering. Korábban feltételezték, hogy a FXIII-B gyulladásos folyamatokban is szerepet játszik, de erre még nem volt konkrét bizonyíték. A protein A-t a Staphylococcus termeli, és a fehérje az IgG Fc régiójához (a CH₂ és CH₃ doménekhez) kötődve részt vesz a mikroorganizmusnak az IgG elleni védelmében. Egy véletlen vezetett rá bennünket a protein A és a FXIII-B közti kölcsönhatás lehetőségére. Kimutattuk, hogy a biotinnal vagy peroxidázzal jelzett protein A szorosan kötődik az FXIII-B-hez és a kötés erőssége hasonló a humán IgG-hez történő kötődés erősségéhez. A protein A mind a szabad FXIII-B-hez, mind a FXIII-A-val komplexben lévő FXIII-B-hez kötődik, jóllehet az utóbbihoz gyengébben. A nyúlban vagy kecskében termelt anti-humán IgG is kötődött a FXIII-B-hez, de nem kötődött a FXIII-A-hoz. Sem az egér IgG ellenes antitest, sem a nem immun IgG nem adott reakciót a humán FXIII-B-vel. A humán IgM ellenes antitesttel, illetve a κ és λ láncok ellenes antitesttel adott reakció jóval kisebb volt, és a humán IgA, illetve IgE ellenes antitesttel a FXIII-B nem adott reakciót. Az

eredmények alapján feltételeztük, hogy a FXIII-B-n van egy olyan epitóp, mely hasonló a humán IgG-n lévő egyik epitóphoz és ez reagál a protein A-val, ill. az anti-humán IgG-vel. A FXIII-B kötődése a protein A-hoz szerepet játszhat a nem specifikus anti-mikrobiális védelmi mechanizmusban. Ez e munkából összeállított és elküldött közleményt a bíráló tanácsára az epitóp identifikálásával kívánjuk kiegészíteni, jelenleg ezen dolgozunk.

1/C Az aktivált FXIII szubsztrát analóg peptidjeinek előállítása és hatásuk vizsgálata

α_2 plazmin inhibitor (α_2 PI) N-terminális dodekapeptidjének [α_2 PI(1-12)] (mely korábbi eredményeink szerint az aktivált FXIII kitűnő szubsztrátja) megfelelő szubsztrát analógokat állítottunk elő és vizsgáltuk ezek viselkedését a FXIIIa által katalizált transzglutamináz reakcióban. A peptid N-terminális szakaszára vonatkozó vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a 2-es pozícióban lévő Gln Asn-re való cseréje esetén a peptid elveszti szubsztrát tulajdonságát, és gátló hatása lesz. Kinetikai vizsgálataink szerint azonban e peptid igen gyenge inhibitor. A 4-es pozícióban lévő Gln Asn-re történő cseréje esetén a szubsztrát kötődés K_m -je közel háromszorosára nőtt, a katalitikus hatékonyság egyharmadára csökkent, azaz a Gln4-nek is van szerepe a szubsztrát kötődésében. Utóbbi megállapítást NMR vizsgálatokkal is igazoltuk. Ha mindkét Gln-t Asn-re cseréltük a szubsztrát tulajdonság elveszett, s gátló hatás sem volt észlelhető. Meglepő, kinetikus mérésekkel és NMR vizsgálatokkal is alátámasztott új megállapításunk, hogy az 1-es pozícióban lévő Asn igen lényeges szerepet játszik az enzim szubsztrát kötésben és a katalitikus aktivitásban. E reziduum elhagyása több mint 10x-éval csökkentette a katalitikus efficienciát.

A dodekapeptid C-terminális részére vonatkozó eredményeinket az alábbiakban összegezhetjük: a) a 12-9 reziduumok egyenként történő elhagyása fokozatosan növelte a K_m értékeket (azaz a kötődés erőssége csökkent), a 11-9 reziduumok elhagyása pedig fokozatosan csökkentette a k_{cat} értékeket; b) STD NMR-rel direkt hidrofób kölcsönhatás volt kimutatható a Thr9 és Leu10,11 reziduumok metil csoportjai és az aktivált FXIII között; c) molekula modellezéssel sikerült olyan, a katalitikus triad-hoz közeleső hidrofób területet identifikálni a FXIIIa felületén (a core domén és a β 1 hordó domén határán), mely felelős a szubsztrát C-terminális részének a kötődéséért; d) az α_2 PI(1-12) C-terminális részének (7-12 reziduumok) megfelelő peptid gátolta a teljes szubsztrát FXIIIa-hoz történő kötődését.

Az e munkából összehozott közleményt közlésre benyújtottuk (Pénzes et al. submitted) és "Molecular mechanism of interaction between activated factor XIII and its acyl donor peptide substrate" címmel prezentáltuk az ezévi nemzetközi Factor XIII Symposium-on Drezdában.

Olyan kinetikai tulajdonságokkal rendelkező inhibítort mindeddig nem találtunk, melyet érdemes lett volna in vivo rendszerben is kipróbálni.

2/ A FXIII-nak és szubsztrátjának, az α_2 plazmin inhibitornak (α_2 PI) meghatározására és kimutatására szolgáló módszerek kidolgozása, ill. továbbfejlesztése.

2/A Új, ill. módosított módszerek kifejlesztése a FXIII aktivitás meghatározására.

a) Kinetikus kromogén teszt a FXIII aktivitás mérésére

Ebben az altémában két területen léptünk előre. Rájöttünk, hogy egyes a kereskedelembe forgalmazott FXIII assay-k súlyos FXIII hiányos betegek esetében

lényegesen fölémérik a plazma FXIII szintjét. Ez a beteg állapotának és a terápia hatékonyságának megítélésénél komoly problémákat okoz. Kiderítettük, hogy ennek oka a reakció elegyben lévő glutamin szubsztrátból nem FXIII által enzimatikusan felszabaduló ammónia, illetve a plazmában jelenlévő piruvát lebomlásából származó NADH konszumpció. Kimutattuk, hogy a FXIII aktivitást gátló anyag jelenlétében mért plazmavak beiktatásával a fölémérés kiküszöbölhető. A munkából a közlemény a Journal of Thrombosis and Haemostasisban jelent meg (Ajzner and Muszbek J Thromb Haemost 2004; 2: 2075-7).

Itt említjük meg, hogy a FXIII aktivitás mérésére szolgáló kinetikus UV tesztünket alkalmazva részt vettünk az első FXIII WHO plazma standard kidolgozásában. Ugyanezen plazma standard FXIII antigén értékének megállapítására a szintén korábban kidolgozott egy lépéses ELISA módszerünket alkalmazta a standardizációs munkacsoport. A vonatkozó közleményt összeállítottuk, a napokban lesz közlésre beküldve.

A FXIII aktivitás mérésére szolgáló optimált kinetikus tesztünk kromogén teszté történő átalakítását az alábbi elképzelésnek megfelelően kezdtük el: a trombinnal és Ca^{2+} -val aktivált FXIII által katalizált transzglutamináz reakció során felszabadult ammóniát glutamin szintetáz enzimmel glutamátba építjük be, miközben ADP-ből ATP keletkezik. Az ADP-t piruvát kinázzal visszaalakítjuk ATP-vé, s a keletkező piruvát mennyiségét piruvát oxidáz-peroxidáz reakcióval kromogén szubsztráttal mérjük. Az elképzelés ugyan működött, de az optimalizáció során kiderült, hogy a keletkező piruvát mennyiségének piruvát oxidáz-peroxidáz reakcióval történő mérése nem felel meg a kinetikus enzimreakciók követelményeinek. Így erőfeszítéseinket az alábbiakban leírt „scintillation proximity assay” kidolgozására koncentráltuk.

b) Nagy érzékenységgű, amin inkorporáción alapuló „scintillation proximity assay” kidolgozása a FXIII mérésére.

A transzglutamináz (az aktivált FXIII egy transzglutamináz) reakció érzékeny mérésére a scintillation proximity assay (SPA) módszerét alkalmaztuk. Egy általunk szintetizált decapeptid poliglutamin (9 Gln és 1 Arg reziduum) szubsztrátot N-terminális végén biotináltunk és streptavidinnel fedett scintillációs réteget tartalmazó mikrotiter lemezhez kötöttünk. Amin szubsztrátként ^3H putreszcint alkalmaztunk. Ha az izotóppal jelölt putreszcint a transzglutamináz a decapeptid glutamin szubsztráthoz köti, a scintillációs réteghez megfelelő közelségbe kerül, s fény kibocsátást indukál. Kimutattuk, hogy a módszer a fentiekben már tárgyalt $\alpha_2\text{PI}(1-12)$ szubsztrát biotinált változatával is működik. A módszert optimalizáltuk és evaluáltuk, az ebből készült közlemény az Analytical Biochemistry-ben jelent meg (Mádi et al. Anal Biochem 2005; 343: 256-62).

c) A FXIII mérésére/detektálására irányuló kutatómunkánkat morfológiai irányba is kiterjesztettük.

A FXIII-A a monocytákban, annak csontvelői precursor sejteiben és a megakaryocytákban is kimutatható. Áramlásos cytometriás technikával kimutattuk, hogy e sejtek malignusan transzformált formáiban (M4, M5 és M7 acut leukémiák) is detektálható a FXIII-A, s kimutatása kiváló marker reakció e leukémiák klasszifikációjában, ill. a chronicus myelomonocytás leukémia diagnosztikájában. Kimutattuk továbbá, hogy egyes esetekben a FXIII-A "lineage" idegen módon lymphoblastokon is megjelenik, s ennek jelentősége van a lymphoblastos leukémiák karakterizálásában. Eredményeinket a Thrombosis és Haemostasis folyóiratban 2

cikkben közöltük (Kappelmayer et al. Thromb Haemost 2005; 94: 454-9; Kiss et al. Thromb Haemost 2006; 96: 176-82).

2/B Immunoassay kidolgozása az α_2 plazmin inhibitor poszttranszlációsan, (proteolitikusan) módosított izoformáinak mérésére

Az α_2 P-nek két N-terminális izoformája van. Az N-terminálisan metionint tartalmazó izoformát (Met-1) szekretálják a májsejtek a keringésbe, melyből egy plazma proteáz 12 aminosavból álló peptidet lehasít, s így az N-terminális aminosav aszparagin lesz (Asn1). A Met1 izoforma igen gyenge szubsztátja az aktivált FXIII-nak, míg az Asn1 izoformát a FXIIIa igen gyorsan a fibrinhez tudja kötni, s ez által védi azt a fibrinolízistől. Mindkét izoforma jelen van a plazmában, arányuk azonban sem egészségesekben sem betegekben nem ismert, pedig ez jelentősen befolyásolhatja a fibrinolízis hatékonyságát, s ezen keresztül a thrombosis készséget is. Célunk olyan ELISA rendszer kifejlesztése volt, mellyel a két izoforma mennyisége és aránya jól mérhető. Az első lépésben olyan monoklonális antitestek előállítását kíséreltük meg, melyek vagy csak az egyik vagy csak a másik izoformával reagálnak. Mind a Met1, mind az Asn1 izoformák N-terminális szekvenciájának megfelelő dodekapeptidet megszintetizáltuk, haemocyaninhoz kötöttük, s ellenük specifikus monoklonális antitesteket termeltünk. Először a Met1 formával specifikusan reagáló antitestet sikerült előállítani. Az Asn1 izoformára specifikus antitest előállítása nehezebb feladat volt, mert itt a proteolízist követően keletkezett neoantigénnel reagáló antitestet kellett termelni. Találtunk olyan klónt, mely a bovin szérum albuminhoz kötött α_2 PI-12-vel és szabad α_2 PI-12-vel is jól reagál, azaz valóban az Asn1 α_2 PI N-terminális részén található neoepitópot detektálja. A monoklonális antitesteket α_2 PI-ellenes poliklonális antitestekkel kiombinálva sikerült az egyes izoformákkal reagáló ELISA rendszereket kialakítani. Tekintettel arra, hogy az így kifejlesztett immunassay-k hasznosíthatók a thrombosis rizikó diagnosztikájában az eljárást előbb szabadalmaztatni kívánjuk, s csak utána tervezzük közlését.

3/ A FXIII különböző patológias állapotokban.

3/A Molekuláris genetikai vizsgálatok FXIII hiányos betegeken

Tekintettel arra, hogy a 2 magyarországi FXIII hiányos beteg mutációi az irodalomban már leírt mutációknak bizonyultak, e vizsgálatok iráni betegek plazma és DNS mintáin történtek. A mintákat Flora Peyvandi-tól iráni származású olasz kollaborációs partnerunktől kaptuk, aki részt vett a minták Debrecenben történő feldolgozásában is. 10 nem rokon iráni beteg esetében végeztük el a fenotípus-genotípus analízist. Két különböző transzglutamináz méréssel csak azon betegeknél találtunk mérhető aktivitást, akik profilaktikus szubsztitúciós terápián voltak. Hasonló eredményt adott a plazma FXIII komplex és a plazmában lévő FXIII-A alegységek immunoassay-vel történő meghatározása. A genotípus meghatározásoknál a FXIII-A génben 4 új mutációt (2 misszenz mutációt és 2 kis deléciót) találtunk, és 2 korábban már közölt misszenz mutációt is észleltünk. A misszenz mutációk strukturális következményeit molekula modellezéssel és energetikai számításokkal kíséreltük meg kideríteni. A mutációk az alábbi arginin rezidumok cseréjét eredményezték: Arg77His, Arg260Cis, Arg260His és Arg382Ser. Az első aminosav csere a FXIII-A β sandwich doménjében, az utóbbi négy a központi ("core") doménben található. Valamennyi mutáció az argininhez kapcsolódó extenzív és strukturális szempontból fontos hidrogénkötés hálózatot szüntette meg vagy károsította. Az energia dekompozíciós analízis azt mutatta, hogy ez a helyzet a molekula instabilitásához és

feltehetően inkorrekt folding-jához vezet, ami magyarázza a súlyos FXIII hiányt. Az eredményeket a Human Mutation folyóiratban közzétük (Peyvandi et al. Hum Mutat 2004;23:98. Mutation in Brief 2003 #677 Online).

A FXIII hiányos betegek mintegy 15-20%-ában sebgyógyulási zavar is van. Az, hogy ez valóban a betegséggel függ össze betegeken nem tanulmányozható, ezért Izraeli kollaborációban FXIII-A knock-out egereken végeztünk sebgyógyulási kísérleteket. Mind durva morfológiai, mind hisztológiai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a sebgyógyulás a FXIII hiányos egereken elhúzódó, irreguláris sebszélekkel, nem megfelelően fomálódott sarjszövettel jár. A normál sebgyógyuláshoz a plazma (és nem a celluláris, macrophagokban, thrombocytákban lévő) FXIII jelenléte szükséges, hiszen plazma FXIII pótló terápiával a normál sebgyógyulás visszaállítható volt. Ez az első kísérletes bizonyíték a FXIII és a sebgyógyulás összefüggésére (Inbal et al. Thromb Haemost 2005; 94: 432-7).

A FXIII hiány még egy eddig ismeretlen következményére mutattunk rá. Kísérleteink bizonyították, hogy FXIII-A hiányos monocyták receptor mediált fagocitózisa csökkent mértékű, felehetően a bekebelezés mechanizmusának károsodása miatt (Sárváry et al. Cellular Immunol 2004; 228: 81-90).

Az öröklött FXIII hiány és a terhességi rendellenességek összefüggéseiről (részben saját tapasztalataink alapján) egy összefoglalóban számoltunk be (Muszbek and Bagoly Thromb Res 2007; 119:S69-70).

Mintegy 10 évvel ezelőtt a European Thrombosis Research Organiztaion (ETRO) keretein belül a témavezető kezdeményezésére felállítottuk a FXIII deficiens betegek regiszterét. Az azóta eltelt idő tapasztalatait és a regiszter kibővítésével kapcsolatos eredményeket a kibővített munkacsoporttal együttesen közzétük (Ivaskevicius et al Thromb Haemost 2007, accepted).

3/B. A FXIII Val34Leu polimorfizmus és FXIII szint, illetve aktivitás meghatározás occlusiv arteriás megbetegedésben

Összefoglalók

E kérdés előzményeinek áttekintésére két olyan nemzetközi kiadású könyvben, ill folyóiratban megjelent összefoglalót készítettünk, melyek alapul szolgáltak a további munkánkhoz (Muszbek et al. In: Arnout J, de Gaetano G, Hoylaerts M, Peerlinck K, Van Geet C, Verhaeghe R editors. Thrombosis: Fundamental and clinical aspects. Leuven: Leuven University Press, 2003. pp. 197-224; Bereczky et al. Pathophysiol Haemost Thromb 2003/2004; 33: 430-7). Az ezirányú kutatások egyértelművé tételéhez az adekvátabb kísérleti leírásokhoz járul hozzá az a nomenclatura ajánlás is, amit az International Society of Thrombosis and Haemostasis Scientific and Standardization Committee keretében dolgoztunk ki (Muszbek et al. J Thromb Haemost 2006; 5: 181-183).

Módszertani munka

Felmérve a tervezett kísérletekhez szükséges nagyszámú FXIII-A Val34Leu polimorfizmus meghatározást kiderült, hogy a hagyományos PCR-RFLP technikával a vizsgálatok rendkívül hosszú időt vennének igénybe. Ezért a Val34Leu polimorfizmus meghatározására kidolgoztunk egy új „real-time” PCR-t alkalmazó módszert, melyben a különböző genotípusokat fluorescens rezonancia energia transzfer segítségével oladási görbe analízissel detektáljuk. Az új módszert Roche LightCycler készülékre adaptáltuk, a hagyományos PCR-RFLP-rel és DNS szekvenálással az új módszer 100 %-os egyezést mutatott. Az e munkából elkészült módszertani közlemény megjelent (Shemirani and Muszbek Clin Chem Lab Med 2004;42:877-9).

a) FXIII szerepe coronaria betegségben

A vizsgálatok során elsősorban a coronaria betegségre koncentráltunk. 1010, a DEOEC Kardiológiai Intézetében feltételezett coronaria betegség diagnózisával másfél év során megjelent coronaria angiographian átesett beteg jelentette a vizsgálatba bevont betegcsoportot. A főbb coronaria ágakban, vagy annak mellékágában $\geq 50\%$ -os szűkületet vettünk coronaria sclerosis pozitívnak (CS+), míg a korábban bekövetkezett myocardialis infarctus diagnózisát (MI+) az ACC és ACS kritériumai szerint tekintettük elfogadottnak. Ennek megfelelően a következő alcsoportokat képeztük: CS–MI– (klinikai kontrollok), CS–MI+ (kis létszámú $n=34$ csoport, ahol az MI szignifikáns CS nélkül következett be), CS+MI– és CS+MI+. Valmennyi vizsgált egyén esetében a kor, nem, diabetes mellitus, dohányzás mellett meghatároztuk a legfontosabb rizikófaktorokat, a FXIII aktivitás és antigén szinteket és a FXIII Val34Leu genotípust. (További, itt nem részletezett analízisek céljából egyéb genotípusok is meghatározásra kerültek.) Megjegyezzük, hogy a genetikai vizsgálatok kivételével a MI bekövetkezte és a laboratóriumi paraméterek meghatározása között minden esetben legalább 3 hónap telt el, hogy akut fázis reakció ne befolyásolhassa az értékeket. Egyes laboratóriumi paraméterek hiánya, ill. az MI bizonytalan diagnózisa miatt 55 egyén kizárásra került, s így végül 955 egyén került a vizsgálatba bevonásra. A genetikai vizsgálatok megfelelő értékeléséhez a DEOEC Megelőző Orvostani Intézetével együtt kialakítottunk egy 1146 személyből álló populációs kontroll csoportot is, mely a magyar népesség átlagát reprezentálta.

Factor XIII szintek coronaria betegségben

E területen eddig néhány közlemény jelent meg döntően vagy kizárólagosan kisebb férfi populációkon vizsgálva a szintek változásait negatív eredménnyel. A megfelelő statisztikai módszerekkel meghatározott független változókra korrigált FXIII aktivitás és antigén szintek az általános betegegyesületünkben sem mutattak változást. A rendelkezésünkre álló nagyszámú beteganyag azonban lehetővé tette a nemek szerint történő bontást. Eredményeink szerint nőkben a korrigált FXIII szintek a CS+MI+ betegcsoportban szignifikánsan magasabbak voltak a klinikai kontrollokban mérteknél és szignifikánsan magasabbak voltak a CS+MI– csoportban mérteknél is. Férfiaknál ilyen eltérést nem észleltünk. Váratlan, de megítélésünk szerint e vizsgálat sorozat igen jelentős eredménye, hogy nőknél az emelkedett FXIII aktivitás és antigén szint (a felső harmadban) kifejezetten (2,5-3,0-szor) fokozta a CS+MI+ rizikóját. A CS-ben szenvedő nők esetében is mintegy 2x-e volt az MI kockázata. Férfiak esetében ilyen kockázatot nem észleltünk. Eredményeink, melyeket a Haematologica folyóiratban közöltünk az első nemre specifikus rizikófaktor felfedezését jelentik a haemostasis rizikófaktorok területén (Berczky et al. Haematologica 2007;92:287-8).

FXIII-A Val34Leu polimorfizmus hatása a coronaria betegség rizikójára; a nagy kockázatú magyar populáció vizsgálata és az irodalmi adatok meta-analízise

A FXIII-A Val34Leu polimorfizmus előfordulását coronaria betegségben több tanulmány vizsgálta, az eredmények azonban ellentmondóak. Több szerző számolt be arról, hogy a FXIII-A Leu34 allél hordozása védő hatású az MI-vel szemben, azonban más munkacsoportok ezt nem erősítették meg. Az egyik feltételezés az volt, hogy a döntően mediterrán országokból származó negatív eredmények ezen országok lakosainak környezeti hatásai miatt egyébként is meglévő jelentős védettségének köszönhetők. Magyarországon a coronaria betegség előfordulása az egyik

legmagasabb az európai államok között, ezért különösen érdekes annak vizsgálata, hogy a Leu34 allél hordozása ebben a populációban rendelkezik-e védő hatással e betegséggel szemben. A Leu34 allél hordozásának protektív hatása nem igazolódott be sem a CS-sel, sem az MI-vel szemben. Ugyanakkor, ha a betegcsoportokat fibrinogén szintek szerint negyedeltük, a fibrinogén szintek felső 25%-ában a Leu34 hordozása szignifikáns védettséget jelentett mind a CS+ (OR: 0,46, CI: 0,22-0,98) mind az MI+ (OR: 0,41, CI: 0,18-0,93) ellen. Tekintettel arra, hogy a CS+ csoport a CS+MI- és a CS+MI+ csoport összege, megvizsgáltuk a helyzetet e két alcsoportban külön külön is. A magas fibrinogén szinttel rendelkező CS+MI- csoportban a Leu34 hordozásának nem volt szignifikáns hatása, míg a CS+MI+ csoportban ez a hatás magasan szignifikánsnak bizonyult (OR: 0,40, CI: 0,18-0,89). Tekintettel arra, hogy a Val34Leu polimorfizmus fibrin struktúrára kifejtett hatása is fibrinogén koncentráció függő klinikai eredményeink elméleti alátámasztást is nyernek. E munkát a Thrombosis Research közlésre elfogadta, s jelenleg az elektronikus verzió már elérhető (Bereczky et al, Thromb Res 2007 doi:10.1016/j.thromres.2006.12.013).

Tekintettel arra, hogy a FXIII-A Val34Leu polimorfizmus coronaria betegségre kifejtett hatására vonatkozó irodalmi adatok nagymértékű szórást mutatnak szükségesnek tartottuk elvégezni az irodalmi adatok meta-analízisét. Az analízis kritériumainak nem megfelelő publikációk kiejtése után 16 e területtel foglalkozó közlemény maradt, beleértve saját előbbiekben ismertetett közleményünket is. Mivel az egyes tanulmányokban közölt rizikóhányadosok nagy szórást mutattak és a heterogenitás teszt is szignifikáns volt az analízist az empirikus random-hatás Bayes modellel végeztük. Az eredmények szerint mind a Leu34 heterozigotáság mind a Leu34 hordozás védőhatása statisztikailag szignifikáns volt (OR: 0,82, CI: 0,73-0,94, ill. OR: 0,81, CI: 0,70-0,92). Gén-gén és gén környezeti kölcsönhatások, mint az ezek által meghatározott magas védettség vagy ellenkezőleg magas rizikó elfedhetik ezt a hatást. A metaanalízis eredményeit a Thrombosis and Haemostasis folyóirat közlésre elfogadta, s jelenleg az elektronikus verzió már elérhető (Vokó et al. Thromb Haemost 2007 doi:10.1160/TH06-11-0669).

FXIII-A Val34Leu polimorfizmus hatása aFXIII szintekre coronaria betegségben

A FXIII-A Val34Leu polimorfizmus FXIII aktivitásra kifejtett hatásával kapcsolatos első közlemény arról szólt, hogy a Leu34 allél számától függően nő az aktivitás. Kiderült, az eredeti szerzők és a mi munkáinkból is, hogy ennek oka módszertani tévedés volt, valójában a FXIII aktivitást a polimorfizmus a normál populációban nem befolyásolja. Most lezárt munkánkban kimutattuk, hogy az olyan Leu34 homozigóta betegeken, akik MI-n estek át a FXIII aktivitása és antigén szintje szignifikánsan csökkent. Tekintettel arra, hogy az antigén és aktivitás szint egyenlő mértékben csökken a plazma FXIII specifikus aktivitása nem változott. Feltételezzük, hogy e betegeknél a véralvadás egy kis fokú krónikus aktivációt mutat, ami a könnyebben aktiválódó Leu34 FXIII egy részét aktiválja, s az aktivált forma gyorsan kiszűrődik a keringésből. Az e munkából írt közlemény megjelenés alatt áll (Bereczky et al. Thromb Res 2007; accepted).

b) FXIII szintek és FXIII-A Val34Leu polimorfizmus perifériás artériás érbetegségben
Eddig mintegy 300 perifériás érbetegnél is meghatároztuk a FXIII-A Val34Leu polimorfizmust, a plazma FXIII aktivitást és antigén szinteket. Eddigi eredményeink szerint okkluzív perifériás érbetegségben a FXIII szint szignifikánsan, mintegy 12-15 %-kal magasabb, mint a kontroll egyéneken. Ugyanakkor úgy tűnik a FXIII-A Leu34 allél jelenléte nem befolyásolja a betegség előfordulási gyakoriságát. Ahhoz, hogy

megfelelő bontásban alcsoportokat tudjunk képezni a betegekből és nem, súlyosság, stb. szerint értékelhessük az eredményeket további betegek bevonására van szükség. E munka folyamatban van.

c) A FXIII-A Val34Leu polimorfizmus ischaemiás stroke-ban

A FXIII-A Val34Leu polimorfizmus hatásáról az ischemias stroke-ban eddig mindössze egyetlen, stroke túlélőkön végzett vizsgálatokat bemutató közlemény jelent meg. Vizsgálatainkba mind stroke-ot túlélőket, mind ischaemiás stroke-ban elhaltak post mortem anyagát szerettük volna bevonni. A vizsgálatok elkezdődtek, azonban kiderült, hogy a leukocytákból szeparált DNS esetén jól működő, korábban használt PCR-RFLP módszerünk postmortem, fixált szövetek feldolgozására nem alkalmas. Az újonnan kifejlesztett FRET technikán alapuló módszerünket hosszas kísérleti munka során sikerült adaptálnunk beágyazott szöveti metszetekből kinyert DNS mintákra. Eddig több mint 150 vizsgálatot végeztünk el, amit további vizsgálatokkal szükséges kiegészíteni. Mindkét csoportban legalább 400-400 minta analízisét tervezzük.

3/C. FXIII szint meghatározása a thrombocyta rendszer kvantitatív rendellenességei esetében

Az autológ perifériás vér összejt transzplantáció előkészítésekor alkalmazott csontvelő abláció során mind a monocyta, mind a thrombocyta szint rendkívül erősen csökken, a monocyta szint azonban ezt követően gyorsan, míg a thrombocyta szint lassan, mintegy 2 hét múlva kezd emelkedni, s a 4. hétre visszatér az eredeti szintre. A plazma FXIII aktivitás és koncentráció a thrombocytaszám csökkenésével párhuzamosan csökken és a két paraméter (thrombocyta szám és FXIII szint) szignifikáns korrelációt mutatott. A monocytaszám csökkenésével ilyen korrelációt nem találtunk. Az csontvelő aplasiás fázisban a thrombocytaszám csökkenése mintegy 95 %-os, ezzel szemben a FXIII csökkenés csak 25 %-os volt. A változás időbeli kinetikájának az elemzése azt bizonyítja, hogy csontvelő aplasiás betegekben – ellentétben az egészséges egyénnel – extra-haematopoietikus sejtek is szintetizálják az FXIII-A alegységét. Az izraeli kollaborációval készült munkából a közleményt a Blood Coagulation and Fibrinolysis közölte (Inbal et al. Blood Coag Fibrinol 2004; 15: 249-53.).

Elvégeztük a magas thrombocytaszámmal járó myeloproliferatív megbetegedésekben is a plazma FXIII aktivitás és antigén szint meghatározását. Eredményeink azt mutatják, hogy mind essentialis thrombocytæmiában, mind egyéb myeloproliferatív megbetegedésben a FXIII szintek megemelkednek. Néhány igen nagy thrombocyta számmal járó esetben extrém magas FXIII szinteket lehetett mérni. A betegek hidroxüreával történő kezelése csökkenti a thrombocytaszámot és ezzel párhuzamosan az FXIII szintet is. Feltételezzük, hogy a nagy mennyiségben képződött, sérülékeny, magas turnover-ű thrombocytákból kikerülő FXIII-A résztvesz a plazma FXIII szint kialakításában. A magas FXIII szint hozzájárulhat e betegek fokozott thrombosis hajlamához. A munka elkészült, jelenleg a közlemény összeállításán dolgozunk.

A thrombocyta rendellenességek vizsgálatát kiterjesztettük a kvalitatív thrombocyta rendellenességekre is, hiszen előkísérleteink szerint pl. Glanzmann thrombastheniában a thrombocyta fehérjék FXIIIa által történő keresztkötése módosul. E vizsgálatokhoz jelenleg a Glanzmann thrombastheniás betegek karakterizálása folyik. Az első ilyen beteg vizsgálatának eredményeit a Thromb Haemost folyóiratban közzétük (Losonczy et al. Thromb Haemost 2005; 93: 904-9).

A vizsgált Glanzmann thrombastheniás betegen sem a plazma FXIII szintje sem a thrombocyta FXIII-A tartalma nem különbözött a kontrollokétól, az thrombocyta aktiváció során a FXIIIa által kialakított kersztkötött fehérjék mennyisége azonban csökkent. További betgek vizsgálatát tervezzük nemzetközi kollaborációban.

3/D α_2 plazmin inhibitor izoformák előfordulási aránya thrombophiliás betegeken

Az e területtel kapcsolatos előkészítő munkánkról a 2/B pont alatt számoltunk be.

3/E. FXIII szint különböző testfolyadékokban és e szintek változásai gyulladásos megbetegedésekben.

A tervezett kísérletek közül először a bronchoalveolaris mosófolyadékban történő FXIII meghatározásokat végeztük el. Az újonan kifejlesztett igen érzékeny két immunoassay-énkkal el tudtuk különíteni a celluláris (FXIII A₂) és plazma (FXIII A₂B₂) faktort és meg tudtuk határozni mindkettőnek a koncentrációját a bronchoalveolaris mosófolyadékban. Egészséges gyermekek esetében, ahol a lavage nem igazolódott idegentest feltételezése miatt történt, kis mennyiségű celluláris FXIII-t találtunk a mosófolyadékban, míg plazma FXIII nem volt észlelhető. Chronicus bronchitis, illetve fibrotikus alveolitis esetén a celluláris FXIII szintje átlagosan a normális 4-5-szörösére emelkedett a bronchiális mosófolyadékban. Áramlásos citometriával kimutattuk, hogy a bronchoalveolaris mosófolyadékban lévő sejtek közül egyedül az alveolaris makrophagok tartalmazzak FXIII-at, így a celluláris FXIII minden valószínűség szerint e sejtekből származik, s mennyisége minden valószínűség szerint e sejtek aktivitását tükrözi. A legtöbb betegben a plazma FXIII is megjelent, ami a fokozott capilláris permeabilitásra utal. Feltételezzük, hogy a FXIII lényeges szerepet játszik a a tüdő krónikus, gyulladásos megbetegedéseiben képződött fibrin turn-overének a szabályozásában, s így e betegségek pathomechanizmusában. A munkából a közlemény a Journal of Thrombosis and Haemostasis folyóiratban jelent meg (Katona et al. J Thromb Haemost 2005; 3: 1407-13).

Az ízületi folyadékból történő FXIII mérések elkezdődtek, de eddig nem tudtunk olyan számú anyagot gyűjteni, hogy az eredményeket érdemben értékelhessük. A liquorból történő FXIII meghatározások 2005 folyamán kezdődtek. Identifikáltuk a FXIII-A jelenlétét, de meglepetésünkre a kizárólag a májban termelt (eddig így tudtuk) FXIII-B-t is megtaláltuk a FXIII-A-nál magasabb koncentrációban. A jelenség okának felderítése szükséges a kutatások további irányának meghatározásához (és az eredmények közléséhez).